

Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*, *Volvocales*) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia

Producción de astaxantina y expresión de genes en *H. pluvialis*

Production of Astaxanthin and Expression of Genes in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*, *Volvocales*) under Conditions of Stress by Nitrogen Deficiency and High Irradiance

Luisa Gómez

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

María Isabel Orozco

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

Carolina Quiroga

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

Juan Camilo Díaz

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

Judith Huérfano

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

Luis Eduardo Díaz

Grupo de Procesos Agroindustriales, Facultad de Ingeniería,
Universidad de la Sabana, Colombia
<https://orcid.org/0000-0002-9588-9935>
lediaz@gmail.com

Jorge Rodríguez

Grupo de Procesos Agroindustriales, Facultad de Ingeniería,
Universidad de la Sabana, Colombia

Judith Elena Camacho K.*

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia
<https://orcid.org/0000-0002-8880-1501>
jelenacamacho@unicolmayor.edu.co

Fecha de recepción: 28 de octubre de 2019

Fecha de aprobación: 23 de enero de 2020

Sugerencia de citación: Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., ... y Camacho, J. E. (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*, *Volvocales*) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Mutis*, 9(2), en prensa, doi: 10.21789/22561498.1532

* Autora de correspondencia.

RESUMEN

La astaxantina es un carotenoide y antioxidante utilizado en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Se produce naturalmente en la microalga *H. pluvialis* cuando esta crece bajo efecto de factores de estrés, como la deficiencia de nutrientes y una irradiancia alta, entre otros. Por lo anterior, se propone como objetivo de esta investigación determinar la producción de astaxantina y la expresión de los genes relacionados con su biosíntesis bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno (4,0 y 5,0 %) y una irradiancia alta. Para este trabajo se realizó un cultivo en medio RM con nitrógeno a 4,0 y 5,0 %, utilizando las siguientes condiciones: pH 6,7; ciclo luz/oscuridad 20 h: 4 h; temperatura 25 °C; agitación continua; CO₂ de 5 %; iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips); e irradiancia alta de 140 µE. Adicionalmente, se utilizó como control el crecimiento en el medio con nitrógeno en concentraciones normales bajo las mismas condiciones durante 36 días. El muestreo se realizó cada tercer día para cuantificación de astaxantina y clorofila y determinación de expresión de genes. El ANOVA realizado estableció que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0,053$). Sin embargo, la producción de astaxantina fue de $3,52 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ con una concentración de nitrógeno al 4,0 % y una irradiancia alta de 140 µE, incrementándose en 40 % frente a la producción obtenida con nitrógeno al 5,0 % ($2,08 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$). Los genes *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* y *chy*, se expresaron con nitrógeno al 4,0 %, mientras que con nitrógeno al 5,0 % solo se expresaron *psy*, *pds* y *chy*.

Palabras clave: microalga, carotenoide, bioproceso, irradiancia, lote, nutrientes.

ABSTRACT

Astaxanthin is an antioxidant carotenoid used in cosmetic, pharmaceutical and food industries that is produced by microalgae *H. pluvialis* in natural form; it is a secondary metabolite that increases production when microalgae grows under stress conditions, like food deficiency and high irradiation, among others. The goal of this research was to test microalgae growing under nitrogen deficiency conditions in a concentration of 4.0-5.0% and evaluate astaxanthin production and gene expression in dye biosynthesis. For this purpose, a culture in RM medium was carried out with 4.0 and 5.0% nitrogen, using the following conditions: pH 6.7; light/dark cycle 20h: 4h; temperature 25 °C; continuous agitation; 5% CO₂; lighting with white fluorescent lamps (Tlt 20w/54RS Philips brand); and a high irradiance of 140 µE. The growth in the medium was used as a control with nitrogen in normal concentrations during 36 days (under the same conditions). Sampling was carried out every third day for quantification of astaxanthin and chlorophyll and the determination of gene expression. The ANOVA performed established that there are no significant differences between treatments ($P = 0.053$). However, astaxanthin production with a nitrogen concentration of 4.0% and a high irradiance of 140 µE was $3.52 \times 10^{-6} \mu\text{g cell}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$, increased by 40% when compared to that obtained with 5.0% nitrogen ($2.08 \times 10^{-6} \mu\text{g cell}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$). The *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* and *chy* genes were expressed with 4.0% nitrogen, while 5.0% nitrogen only allowed *psy*, *pds* and *chy*.

Keywords: Microalgae, carotenoid, bioprocess, irradiance, batch, nutrients.

INTRODUCCIÓN

H. pluvialis es una microalga verde unicelular de agua dulce (Martínez-Silva, 2011) que tiene la capacidad de producir altas concentraciones de astaxantina de buena calidad. Esta producción se obtiene como mecanismo de protección y resistencia de la microalga frente a diferentes cambios drásticos en el ambiente (Kurmen, González, & Klotz, 2013; Domínguez-Bocanegra, Legarreta, Jerónimo, & Campocosio, 2004; González, Cifuentes, & Gómez, 2009) tales como: temperatura, intensidad lumínica, ciclos de luz-oscuridad (Wan *et al.*, 2014), concentración de nutrientes (Cifuentes *et al.*, 2003; Gong & Chen, 1998), pH (Sarada, Tripathi, & Ravishankar, 2002), las especies reactivas de oxígeno, las sales (Kobayashi, Kakizono, & Nagai, 1993), el medio de cultivo (Brinda, Sarada, Kamath, & Ravishankar, 2004; González *et al.*, 2009; Imamoglu, Dalay, & Sukan, 2007) y las concentraciones de nitrógeno (Wang *et al.*, 2014), características que le permiten acumular grandes cantidades del carotenoide (Kurmen *et al.*, 2013).

La astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β , β -caroteno) es un pigmento carotenoide de gran importancia ya que es un antioxidante que neutraliza los radicales libres que dañan las células (Candelas-Cadillo *et al.*, 2005). La astaxantina es de color rojo y es responsable de la coloración de la piel de algunos animales marinos como mariscos, langostas y camarones, los cuales no tienen la capacidad de sintetizarla, por lo tanto, este compuesto es suministrado en el alimento; en la industria de este tipo de alimentos, el uso de pigmentos carotenoides cumple como función principal actuar como antioxidante y promotor de la producción de vitamina A (Ponce-Palafox, Arredondo-Figueroa, & Vernon-Carter, 2006). Además, la astaxantina está unida a una proteína que define la capacidad de absorber el pigmento en el músculo del pez (Armenta, Guerrero-Legarreta, & Huerta, 2002).

La astaxantina posee otras aplicaciones en diferentes industrias, como la farmacéutica y cosmética, donde cumple funciones como protector solar, al prevenir el daño de la piel causado por los rayos UV, contribuye como un factor antienviejecimiento y protector de la piel, aumenta la actividad inmunológica y la salud cardiovascular, disminuye los triglicéridos, aumenta el rendimiento y la recuperación física, es un potente antiinflamatorio y favorece la recuperación en la artritis y el asma (Cerón, 2013; Domínguez *et al.*, 2004). En la industria farmacéutica es un ingrediente de suplementos dietarios. Por su parte, en la industria cosmética es empleada en la protección de las membranas celulares contra el ataque de radicales libres (Kurmen *et al.*, 2013).

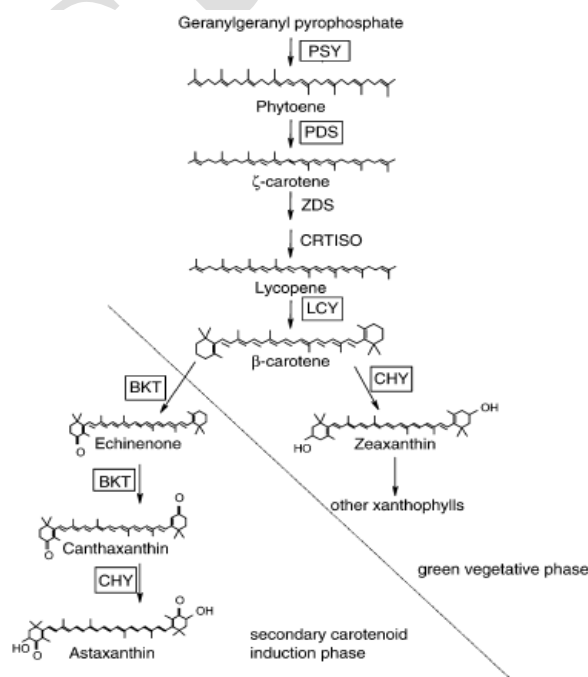
Este pigmento carotenoide es producto del metabolismo secundario de la microalga *H. pluvialis*, de la cual representa 4,0 % del peso seco. El interés por la producción y comercialización de este pigmento ha llevado a que se destaque el cultivo de *H. pluvialis* como una fuente natural de gran interés debido a la calidad del pigmento que se obtiene de ella (Abalde, Orosa-García, Torres, & Cid, 1999). Esta microalga se comercializa a razón de USD 2500 por kilogramo y cuenta con un mercado mundial anual estimado en USD 200 millones. De otro lado, la demanda de astaxantina sintética hace que el consumo sea menos saludable, dando paso a la oportunidad de producir de astaxantina de forma natural mediante la microalga *H. pluvialis* (Ramírez-Landínez, 2013).

Una vez la microalga es expuesta a crecimiento bajo diferentes factores de estrés, se produce un estímulo en la producción de astaxantina que es seguido por cambios morfológicos que van desde un estado vegetativo, en la cual se encuentra con presencia de flagelos, pasando por el estado *palmella*, donde es circular desprovista de flagelos, hasta llegar a la *aplanóspora*, la cual es una célula esférica, roja y sin flagelos producida como respuesta al estrés producido para lograr la supervivencia.

La microalga *H. pluvialis* contiene 70 % de monoésteres de astaxantina, 10 % de diésteres de astaxantina y 5,0 % de astaxantina libre. El restante 15 % está compuesto por β -caroteno, cantaxantina, luteína y otros carotenoides (Córdoba-Castro *et al.*, 2015). El aumento en la producción de astaxantina se ve reflejada cuando existe limitación de algunos nutrientes, la exposición a luz directa y la adición de otras sustancias en fase tardía de crecimiento, como el acetato de sodio, el cual hace que las aplanosporas tengan mayor peso seco y mayor contenido de pigmento. Una de los factores de estrés de mayor interés para aumentar la síntesis de este carotenoide, es la deficiencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo, esenciales en el proceso de síntesis de este compuesto (Nunes *et al.*, 2013).

La producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* se genera por reacciones enzimáticas reguladas por la expresión de los genes involucrados en su ruta biosintética, tales como fitoeno sintasa (*psy*), β -caroteno ketolasa (*bkt*), β -caroteno hidroxilasa (*chy*), fitoeno desaturasa (*pds*) y licopeno β -ciclaza (*lcy*) (Steinbrenner & Sandmann, 2006; Vidhyavathi, Venkatachalam, Sarada, & Ravishankar, 2008; Vidhyavathi, Sarada, & Ravishankar, 2009), como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Ruta de síntesis de carotenoides secundarios en *H. pluvialis*



Fuente: Steinbrenner y Sandmann (2006).

Teniendo en cuenta la capacidad de *H. pluvialis* para producir y acumular gran cantidad de astaxantina, así como la necesidad de determinar las condiciones óptimas para aumentar su producción, el objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la deficiencia nitrógeno, al 5,0 y 4,0 %, sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina, para efectos de seleccionar condiciones de proceso que permitan escalar su cultivo y producir una buena cantidad de este carotenoide.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y cultivo

La Microalga *H. pluvialis* fue obtenida de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas (UTEX 2505), Estados Unidos, y suministrada por la facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana, Colombia. La cepa se mantuvo en medio sólido y líquido Mes-Volvox (por recomendación de la UTEX), a baja irradiancia y una temperatura entre 15 y 20 °C.

El cultivo se realizó en medio de cultivo Mes-Volvox, el cual consistía de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 11,8 g 100 mL⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g 100 mL⁻¹, $\text{Na}_2\text{glicerofosfato} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g L⁻¹, KCl 0,05g/L, MES 1,95 g L⁻¹, solución de metales PIV 6 ml L⁻¹, NH_4Cl 0,026 g L⁻¹, Vitamina B₁₂ 1ml L⁻¹, HEPES y biotina 1 ml L⁻¹, ajustado a pH 6,7, luz blanca provista por lámparas fluorescentes (Tlt 20w/54RS marca Philips) con una irradiancia de 90 µE, fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de 25 °C, CO₂ al 5,0 % y agitación manual de 10 segundos al día. El cultivo se monitoreo por medio de microscopía en cámara de Neubauer para conteo y evaluación de parámetros como color (pigmento), morfología y viabilidad celular, cada tercer día.

Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la producción de astaxantina Preparación del cultivo

El cultivo de *H. pluvialis* se realizó en sistema *batch* por triplicado para cada tratamiento a ensayar, utilizando el medio de cultivo RM, el cual consistió de NaNO_3 300 mg L⁻¹, K_2HPO_4 80 mg L⁻¹, KH_2PO_4 60 mg L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 58,5 mg L⁻¹, EDTA 7,5 mg L⁻¹, NaCl 20 mg L⁻¹, H_3BO_3 0,3 mg L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mg L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg L⁻¹, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,3 mg L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg L⁻¹, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,26 mg L⁻¹, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 17 mg L⁻¹, ajustado a pH 6,7 (Imamoglu *et al.*, 2007). Los tratamientos a ensayar fueron medio RM con concentraciones de nitrógeno normales, utilizado como control del estudio 300 mg/L de NaNO_3 , con deficiencia de nitrógeno al 4,0 %, 12,010 mg L⁻¹ de NaNO_3 (tratamiento 1) y con deficiencia de nitrógeno al 5,0 %, 15,013 mg L⁻¹ de NaNO_3 (tratamiento 2). El medio estéril con el pH ajustado se adicionó en biorreactores de 500 ml hasta un volumen de 350 ml. Los biorreactores se sellaron para garantizar esterilidad.

Se procedió a adicionar el inóculo de la microalga con una concentración de 1×10^4 células mL⁻¹ a cada biorreactor. Se realizó el cultivo bajo las siguientes condiciones: pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h: 4h, temperatura 25 °C, agitación continua, CO₂ 5 %, iluminación con

lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) e irradiancia de 140 μE . La toma de muestra se realizó cada tres días en forma aséptica. La conservación de las muestras se realizó en solución forma salina (1:9), en una proporción 1:1. Se tomaron 1,0 mL para realizar control del cultivo (conteo celular, viabilidad, morfología y registro fotográfico) y el resto de muestra se utilizó para medición de pH. Además, se tomaron 10 mL para cuantificación de pigmentos y 10mL para detección de genes. El tiempo de estudio fue de 36 días.

Determinación de concentración de clorofila y astaxantina

Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante (medio de cultivo). Al paquete celular se le adicionó 1.0 mL de metanol al 90 % y se calentó durante 10 min a 60 °C en baño serológico y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min (APHA, 1992).

Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se realizó la curva de calibración con patrones de referencia, para lo cual se hizo la lectura espectrofotométrica en el equipo Thermo Scientific Evolution 201 a una longitud de onda de 667nm para clorofila y 477nm para astaxantina, tras lo cual se hallaron concentraciones en ($\mu\text{g/mL}$). Para la elaboración de las gráficas se utilizó la ecuación 1:

$$\frac{\text{Concentración } \mu\text{g/mL} \times \text{volumen muestreado (mL)}}{\text{Número de células en conteo en cámara (cel./mL)} \times \text{volumen muestreado (mL)}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Los resultados se expresaron en $\mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. Con base en dichos resultados, se realizaron gráficas para cada tratamiento de nitrógeno aplicado a los biorreactores.

Aislamiento de ARN y PCR

La extracción de ARN se hizo con Trizol (Invitrogen). La transcripción reversa se realizó siguiendo el protocolo RT2 First Strand Kit de la casa comercial Qiagen (2011). Los primers utilizados para la amplificación de *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* y *chy* fueron diseñados por Vidhyavathi *et al.* (2008) y se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Genes específicos y temperaturas usadas en RT-PCR.

Primer	Secuencia primer (5'- 3')	T (°C)	Ciclos de amplificación	ID GenBank/ referencia	Tamaño amplicones (pb)
PSY- forward	ATGTACCATCCCAAGGCAAG	60	30	AY835634	402
PSY- reverse	CTGGACCAGGCCTACGAC				
PDS- forward	TCCATGATCTTTGCCATGC	60	30	AY768691	462
PDS- reverse	CGGGAGTTGAACATGAGGTC				
LCY- forward	CTTCTTCTCCGCCTTCTTCA	60	30	AY182008	565
LCY- reverse	GCATCCTACCGCTCAAAGAA				
BKT- forward	CATCTCCTTGTACGCCTGGT	55	30	X86782	423
BKT- reverse	CAGTGCAGGTCGAAAGTGGTA				
CHY- forward	CTACACACAGCGCAAGTA	55	30	AF162276	521
CHY- reverse	GCCTCACCTGATCCTACCAA				

Fuente: Vidhyavathi *et al.* (2008).

La separación de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 1,5 %. Para su lectura e interpretación se utilizó el equipo BIORAD con un sistema de documentación de

geles Gel Doc XR por luz UV, mediante el programa Quantity One. Se realizó la secuenciación de los productos de PCR (Mendoza *et al.*, 2001) utilizando el secuenciador ABI 3730xl, obteniendo registro de los datos en tiempo real con el sistema LIMS (sistema de registro de laboratorios) y ofreciendo lectura de 650 pb a 1050 pb con criterio de calidad QV20. Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Chromas Lite versión 2.5.1 formato ab1.

Las secuencias en formato FASTQ obtenidas fueron interpoladas al programa *The Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), con el fin de encontrar la identidad de cada una de las secuencias analizadas y así confirmar la presencia de los genes de la cascada de biosíntesis de la astaxantina. La determinación de expresión de genes se realizó en el muestreo 6 (día 18 del cultivo), el muestreo 8 (día 24) y el muestreo 12 (día 36). Los muestreos se seleccionaron por la producción de astaxantina obtenida y se analizaron para cada tratamiento (nitrógeno al 4 %, nitrógeno al 5 % y control) (Chavarro, 2011).

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento ensayado. Se aplicó el Software Dm FIT, con base en el modelo de Baranyi y Roberts (1994), para ajustar las curvas de crecimiento obtenidas. Además, se realizó un análisis de varianza ANOVA (95 %) usando Excel 2010, para determinar diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

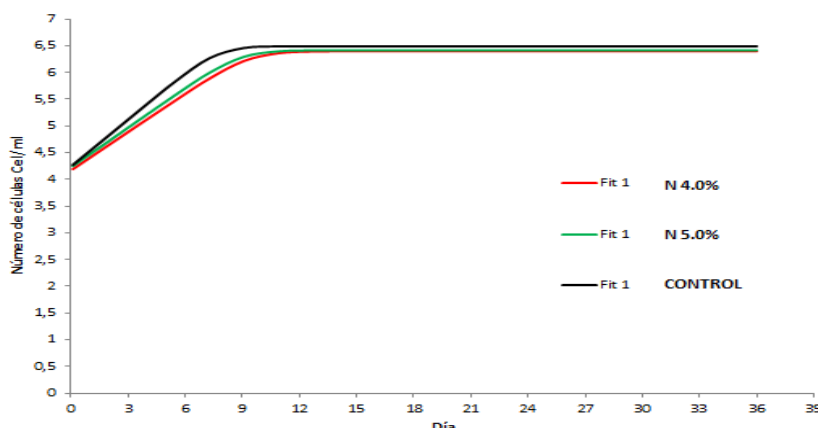
RESULTADOS

Cultivo de *H. pluvialis*

El crecimiento de *H. pluvialis* en el tratamiento control fue de 4.83×10^6 cel. mL⁻¹, en el cual se utilizó el medio RM con la concentración de nitrógeno en la cantidad establecida para este medio (Niño-Castillo, Rodríguez-Rivera, Díaz, & Lancheros-Díaz, 2017). En el caso del tratamiento con medio RM con concentración de nitrógeno al 4,0 % el crecimiento registrado fue de 2.10×10^6 cel mL⁻¹, mientras que para el tratamiento con medio RM con concentración de nitrógeno al 5,0 % fue de 1.38×10^6 cel. mL⁻¹. En el control se observó un crecimiento mayor debido a que el medio de cultivo no presenta deficiencia de ningún nutriente (figura 2).

La velocidad de crecimiento para el control fue de 0,0030 cel. día⁻¹, para el tratamiento con concentración de nitrógeno al 4,0 % fue de 0,0029 cel. día⁻¹ y para el tratamiento con concentración de nitrógeno al 5,0 % fue 0,0028 cel. día⁻¹, observando una velocidad de crecimiento mayor en el control con respecto a los tratamientos donde se utilizó una concentración de nitrógeno al 4,0 y 5,0 %.

Figura 2. Crecimiento de *H. pluvialis* para los tratamientos: control, nitrógeno 4,0 % y nitrógeno 5,0 %



El crecimiento de la microalga es una variable a tener en cuenta debido a que se puede ver afectada según la fuente de nitrógeno proporcionada por el medio. Según Sarada *et al.* (2002), el medio *basal bold* (BBM) que contiene nitrato de sodio, nitrato de amonio, nitrato de potasio y nitrato de calcio, arrojó resultados favorables con respecto a la producción de biomasa y astaxantina. Los resultados obtenidos en esta investigación, donde se utilizó el medio RM que contiene nitrato de sodio, permitió confirmar que la presencia de este nutriente es importante para el crecimiento de esta microalga, puesto que ni su deficiencia evitó observar crecimiento de esta microalga, identificando la fase exponencial en los tratamientos ensayados entre el día 9 y el día 18.

En el día 18 se obtuvo para el control una concentración de *H. pluvialis* de $4,23 \times 10^6$ cel. mL⁻¹. En el tratamiento con medio RM y concentración de nitrógeno al 4,0 % se obtuvo un crecimiento de la microalga de $1,85 \times 10^6$ cel. mL⁻¹ y para el tratamiento de medio RM con concentración de nitrógeno al 5,0 % se obtuvo una concentración de $3,20 \times 10^6$ cel. mL⁻¹, mostrando que en el tratamiento donde se utilizó una concentración de nitrógeno al 4,0 % disminuyó el crecimiento de esta microalga en 56 % frente al control. Por su parte, para el tratamiento donde se empleó en el medio una concentración del 5,0 %, el crecimiento de la microalga disminuyó 24 % frente al control.

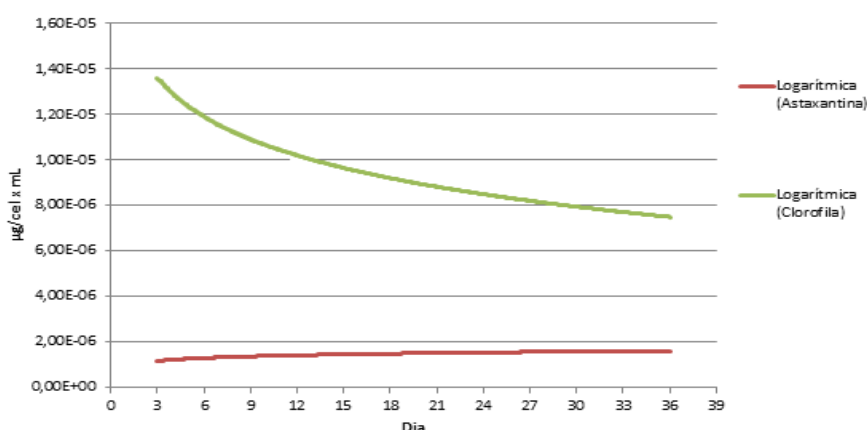
En el día 21 de cultivo se obtuvo para el control un crecimiento de la microalga de $3,25 \times 10^6$ cel. mL⁻¹. Para el tratamiento con concentración de nitrógeno al 4,0 % se registró un crecimiento de $1,76 \times 10^6$ cel. mL⁻¹ y para el tratamiento con concentración con nitrógeno al 5,0 % de $2,50 \times 10^6$ cel. mL⁻¹. Se observa que el crecimiento de la microalga en el tratamiento con medio RM con concentración de nitrógeno al 4,0 % disminuyó 46 % y en el tratamiento con medio RM con concentración de nitrógeno al 5,0 % disminuyó 23 % con respecto al control, en ambos casos. Estos resultados indican que la concentración de nitrógeno sí afecta el crecimiento de la microalga y que a menor concentración menor será su crecimiento, disminuyendo hasta 46 %.

Efecto de la deficiencia de nitrógeno y una irradiancia alta de 140 μE sobre la producción de astaxantina

El cultivo de *H. pluvialis* utilizado como control presentó una concentración inicial de astaxantina de $1,60 \times 10^{-7} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ (muestreo 1, día 3), la cual fue en aumento hasta obtener una concentración final de $1,33 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ (muestreo 12, día 36) en el día 36 del experimento, con un incremento de 88 % (figura 3) y una disminución de la clorofila a medida que transcurría el crecimiento de la microalga. En el experimento se registró una concentración inicial de clorofila de $1,60 \times 10^{-5} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ y una concentración final de $7,38 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$, con una disminución de la concentración de este pigmento de 53 %.

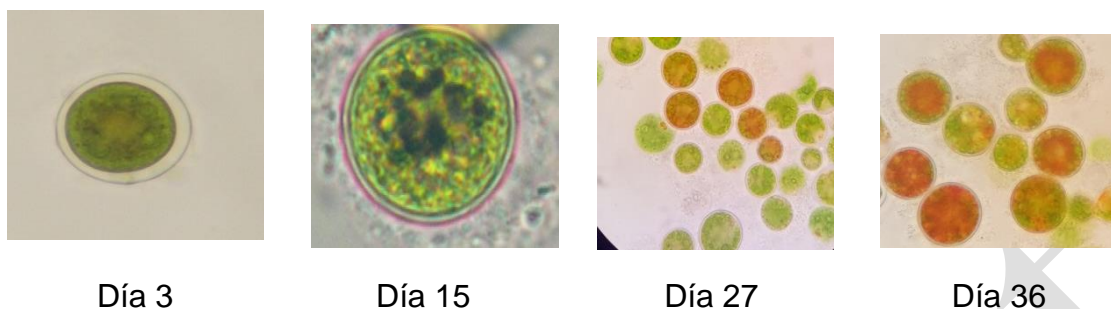
En la microalga *H. pluvialis* la disminución del nitrógeno es un factor que inhibe la biosíntesis de clorofila *a* y promueve la degradación de la clorofila *b*, como expresan Scibilia, Girolomoni, Berteotti, Alboresi y Ballottari (2015), quienes indican que la falta de nitrógeno impide la producción de clorofila en condiciones normales, retrasando así el proceso llevado a cabo por la microalga de fotosíntesis.

Figura 3. Concentración de astaxantina y clorofila (tratamiento control)



En la figura 3 se observa que la concentración de astaxantina tiene un comportamiento inversamente proporcional a la concentración de clorofila durante el proceso de crecimiento de *H. pluvialis*. Esto se debe a que en el tratamiento control, el cual contiene las concentraciones de nitrógeno adecuadas para el crecimiento de esta microalga, se observó microscópicamente que en el día 27 de crecimiento (muestreo 9) iniciaba la acumulación del pigmento en concentraciones mínimas, dándose una relación inversamente proporcional entre clorofila y astaxantina, con un aumento notorio de este último (figura 4).

Figura 4. Morfología tratamiento control. 40X



En la producción de astaxantina para el tratamiento donde se utilizó medio RM con una concentración de nitrógeno al 4,0 %, expresada en $\mu\text{g}/\text{cel.} \times \text{mL}$ vs. días de muestreo, se observó que al comparar el control (figura 3) con el tratamiento con medio RM con nitrógeno al 4,0 %, este último tuvo una mejor producción de astaxantina (62 %) con una concentración de $3,52 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ en el día 36 muestreo 12 (figura 5). La concentración de clorofila disminuyó a medida que la producción de astaxantina aumentaba con una concentración inicial (muestreo 1, día 3) de $4,23 \times 10^{-5} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ de muestra y una concentración final (muestreo 12, día 36) de $3,73 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ (figura 6), mostrando una disminución de 91 %.

Figura 5. Concentración de astaxantina y clorofila (tratamiento con nitrógeno 4,0 %)

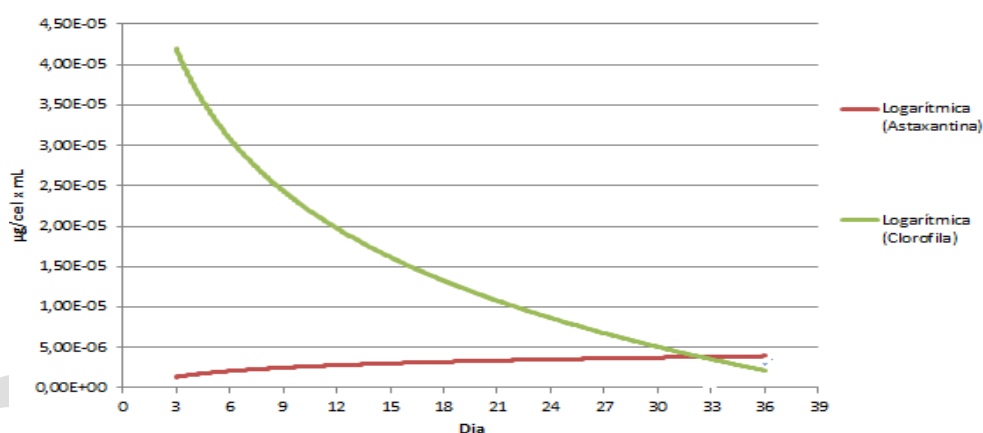
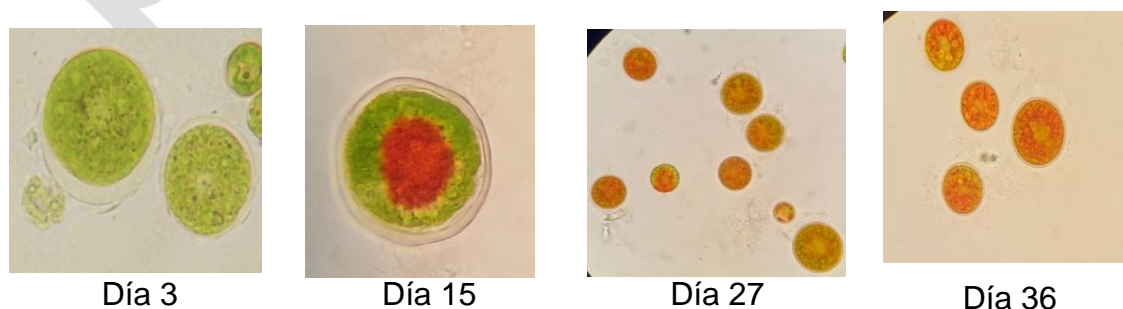


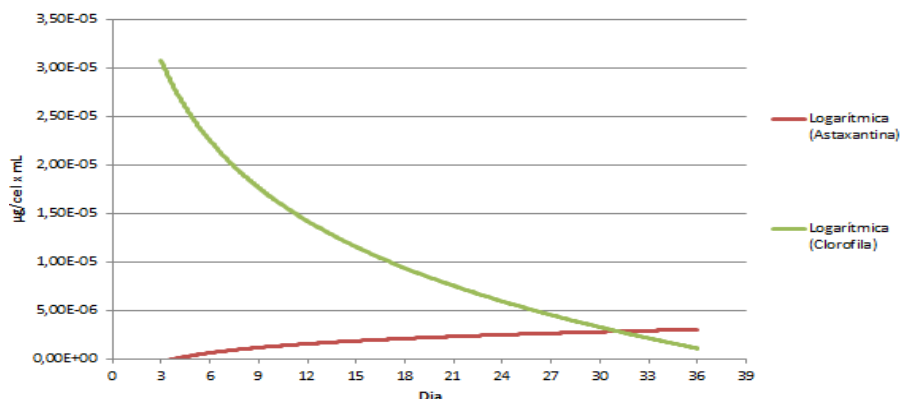
Figura 6. Morfología del tratamiento con nitrógeno al 4,0 % (40X)



En el tratamiento en medio RM con una concentración de nitrógeno al 5,0 % en $\mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ vs. días de muestreo, se observó el mismo comportamiento del control (figura 3) y el tratamiento con nitrógeno al 4,0 % (figura 5), en los que se reiteró que la producción de clorofila es inversamente proporcional a la producción de astaxantina. La figura 7 permite evidenciar que este tratamiento tuvo una menor eficiencia de producción de astaxantina con respecto al tratamiento de RM con nitrógeno al 4,0 %, con una concentración de $2,08 \times 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ al día 36 (muestreo 12).

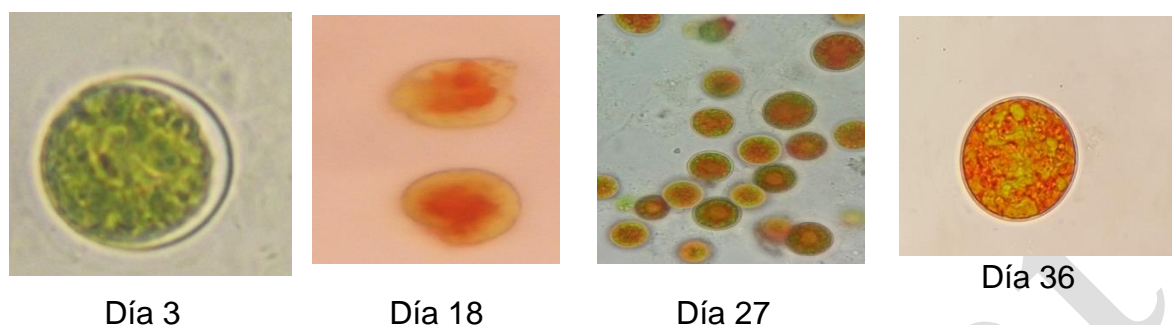
Al comparar la producción de astaxantina del tratamiento de RM con nitrógeno al 5,0 % con el control (figura 3) se observó que la producción fue mayor, por lo que se concluye que el factor de estrés de una concentración de nitrógeno al 5,0 % favorece la producción del pigmento. La concentración de clorofila descende a medida que aumenta la concentración de astaxantina, la cual inició con una concentración (muestreo 1, día 3) de $1,69 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel} \times \text{mL}$ y terminó con una concentración final (muestreo 12, día 36) de $1,85 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel.} \times \text{mL}$, mostrando una disminución de 89 %.

Figura 7. Concentración de astaxantina y clorofila (tratamiento con nitrógeno al 5,0 %)



La diferencia de producción y/o acumulación del pigmento comparado con el tratamiento en el que se usó nitrógeno al 4,0 % fue de $1,44 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel.} \times \text{mL}$, mostrando una disminución de 41 % que evidencia que el tratamiento con una concentración de nitrógeno al 5,0 % favorece la producción, aunque no en cantidades mayores a las del tratamiento con una concentración de nitrógeno de 4,0 %. Este tratamiento (nitrógeno al 5,0 %) se observó microscópicamente, dando resultado de estrés al día 18 (muestreo 6), lo que indica que el proceso de síntesis de astaxantina es más lento en este tratamiento comparado con el tratamiento con una concentración de nitrógeno al 4,0 % (figura 8).

Figura 8. Morfología con tratamiento de nitrógeno al 5,0 % (40X)



Al comparar la producción de astaxantina en los tratamientos 1 y 2 y control, se observó que la producción fue 40 % mayor en el tratamiento 1, con lo que se concluye que el factor de estrés en el cual se utilizó una concentración de 4,0 % de nitrógeno y una alta irradiancia es favorable para obtener una muy buena producción del pigmento.

El análisis estadístico realizado (ANOVA 95 %) para estos tratamientos evidenció que no existen diferencias significativas entre el tratamiento de nitrógeno al 5,0 y 4,0 % combinadas con la irradiancia alta ($P = 0,053$). Sin embargo, los niveles de astaxantina son 40 % mayores en la concentración obtenida en este estudio para el tratamiento con nitrógeno al 4,0 %, combinado con la irradiancia alta utilizada (140 μE), que para el tratamiento que contiene 5,0 % de nitrógeno.

Expresión de genes

Se observaron la expresión de genes pertenecientes a la cascada de producción de astaxantina. Estos genes se denominan fitoeno sintetasa (*psy*), β -caroteno Hidroxilasa (*chy*), fitoeno desaturasa (*pds*), licopeno β -ciclaza (*lcy*) y β -caroteno ketolasa (*bkt*), y son fundamentales para llevar a cabo el proceso de producción/o biosíntesis del carotenoide. La expresión del gen *bkt* se da gracias a que este se encuentra en mayores cantidades cuando en estado de célula verde flagelada y va disminuyendo a medida que esta se desarrolla, como afirman Huang, Chen y Sandmann (2005), cuando la expresión del gen aumenta su concentración debido a que la microalga se expone a factores de estrés y se detecta en concentraciones basales al completar la cascada de producción de astaxantina (figuras 9 y 10).

En cuanto al gen *pds*, se puede afirmar que se encuentra presente siempre que hay concentraciones de ARNm durante el periodo de acumulación de astaxantina, lo que refiere que es regulado según el nivel de ARNm disponible, como sostienen Grünwald, Eckert, Hirschberg y Hagen (2000), quienes afirman que este gen se encuentra en el cloroplasto y regula la producción de astaxantina, la cual, a su vez, es regulada por la disponibilidad de ARNm en el momento de la síntesis y acumulación del caroteno; por ende, en los resultados de la electroforesis y PCR para este gen, se observa que siempre estuvo presente durante la biosíntesis, con una mayor intensidad en el tratamiento con nitrógeno al 4,0 % (figura 9). Por otra parte, los factores de estrés ambientales aumentan las condiciones estacionales de los genes *psy* y *chy*, logrando la regulación diferencial de

los niveles de ARNm de los genes de la biosíntesis de astaxantina, como expresan Steinbrenner y Linden (2001), quienes refieren que los ARNm de estos genes están regulados en respuesta a diferentes condiciones de estrés.

Figura 9. Expresión de genes en el control

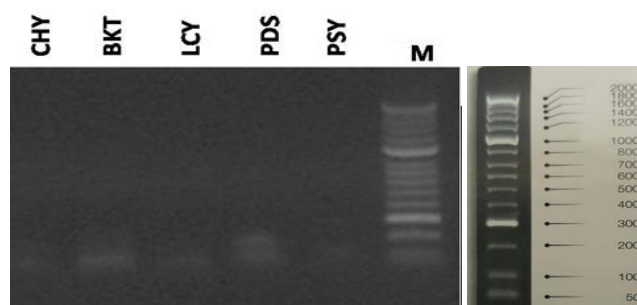
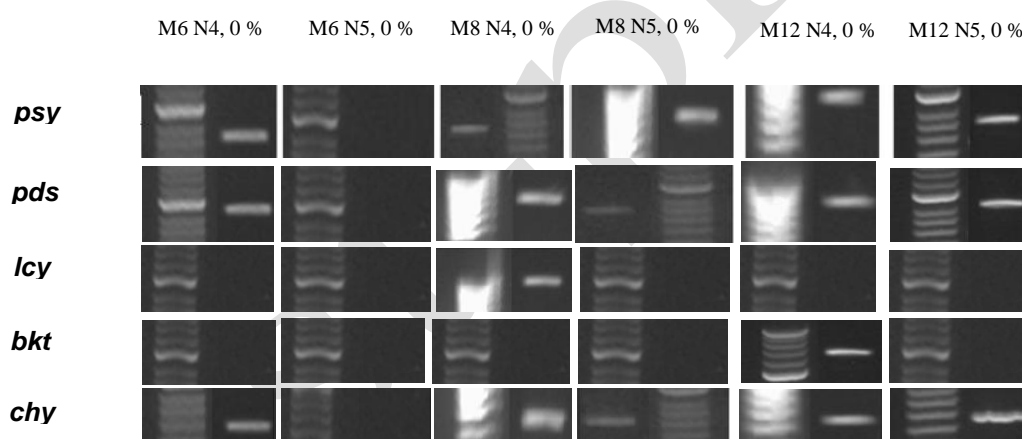
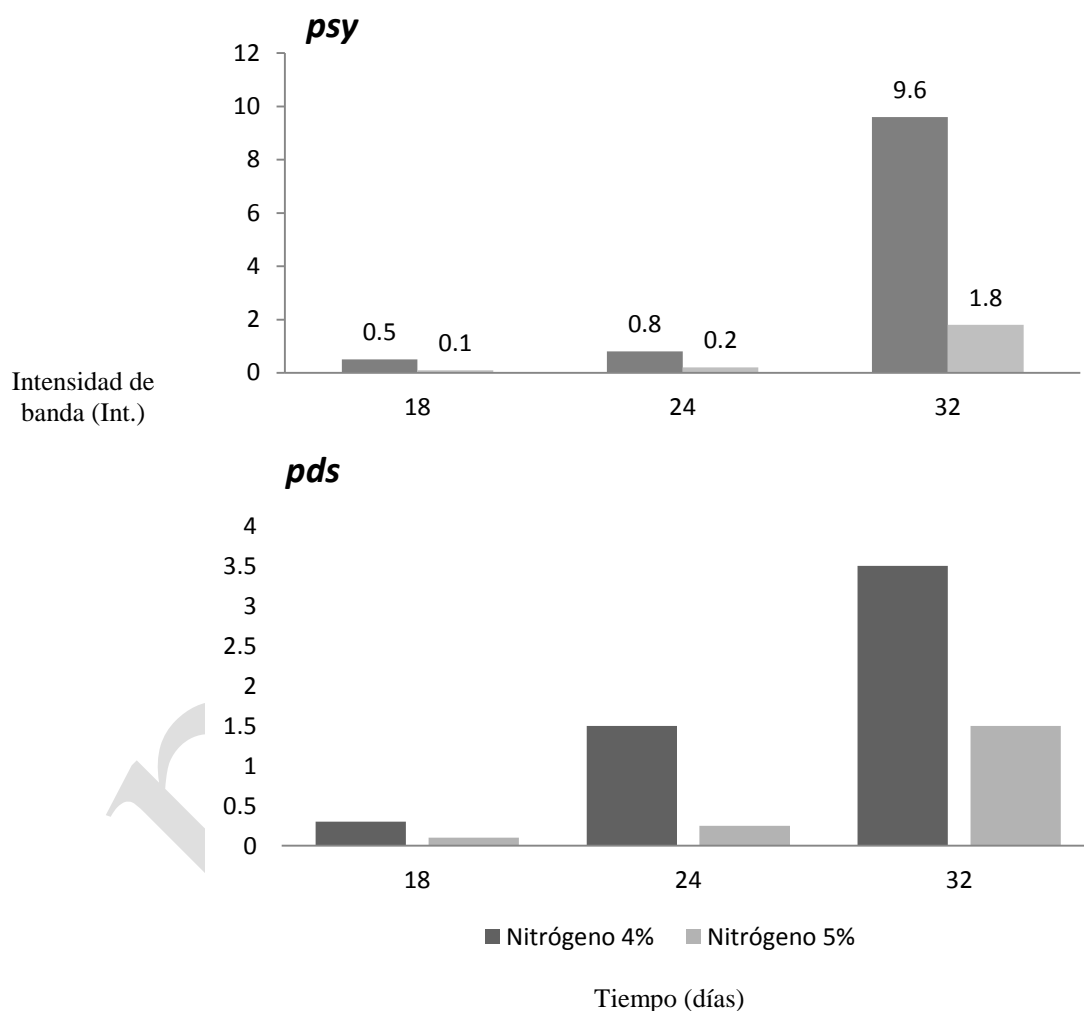


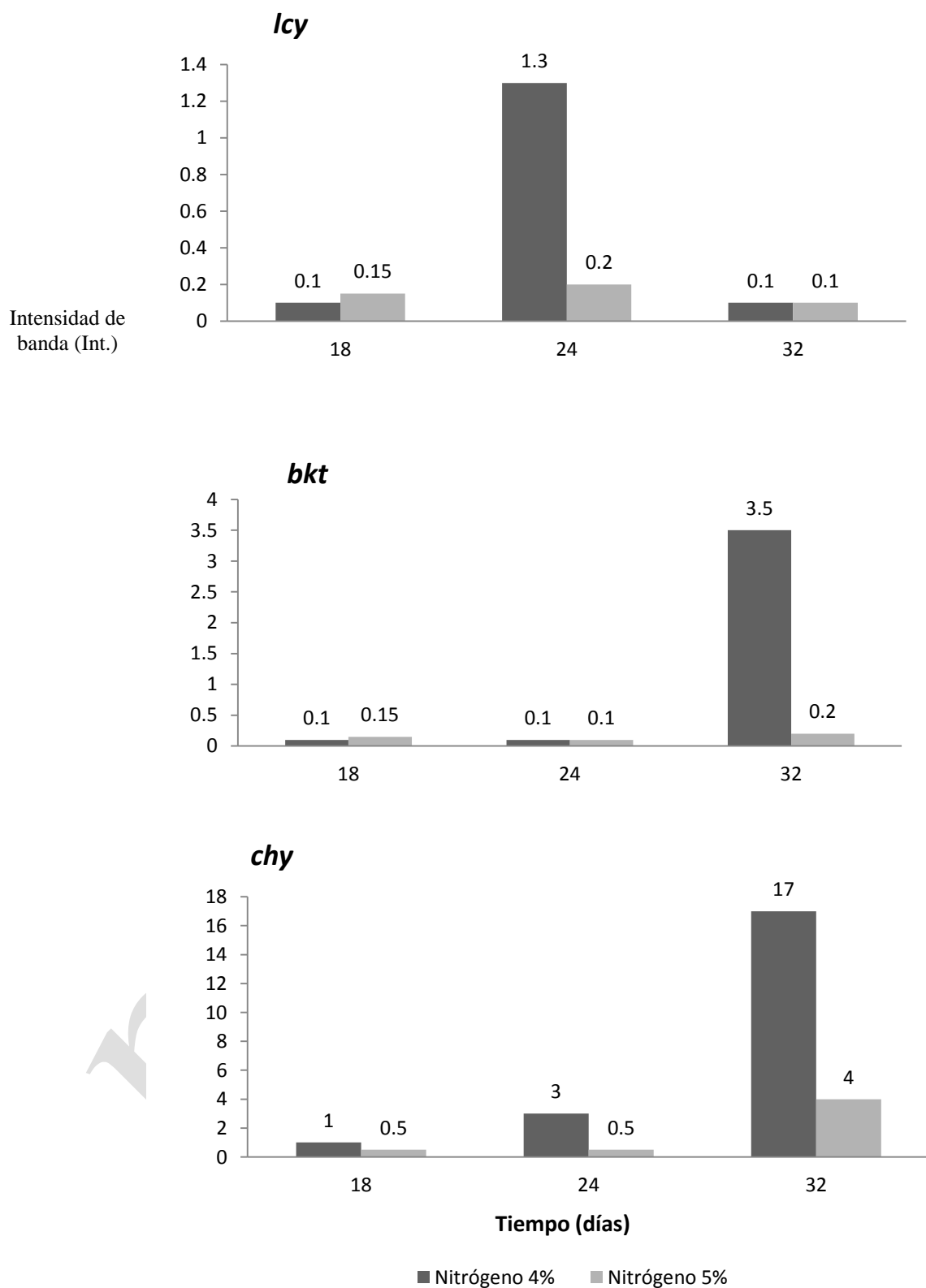
Figura 10. Expresión de genes de la ruta biosintética de la astaxantina en los tratamientos nitrógeno 4,0 %, nitrógeno 5,0 % día 18 (muestreo 6), día 24 (muestreo 8) y día 36 (muestreo 12)



La expresión de *psy* y *chy* se evidenció en todos los muestreos 6 día 18, muestreo 8 día 24, muestreo 12 día 36 del tratamiento de nitrógeno al 4,0 %, en comparación con el tratamiento de nitrógeno al 5,0 %, donde se observa solo expresión de estos genes en los muestreos 8 (día 24) y 12 (día 36) (figuras 9-11). En cuanto al gen *lcy*, este se observó solo en el muestro 8 (24 día) del tratamiento con nitrógeno al 4,0 %, lo que se concluye que la disponibilidad de ARNm en ese momento del experimento no era la suficiente para expresión de la mayoría de los genes (*psy*, *pds*, *lcy* y *chy*).

La ausencia de expresión de genes de la ruta biosintética de la astaxantina para el control se debe a que este medio de cultivo RM no presentó ninguna condición de estrés en la deficiencia de nutrientes, ya que cuenta con los niveles adecuados de nitrógeno; hecho que no influye en la producción y acumulación de astaxantina. Referente a esta situación, en el muestreo 6 con nitrógeno al 5,0 % se evidenció una ausencia similar de los genes de la síntesis del carotenoide. Esto se debe a que la concentración de ARNm en este





Como se mencionó previamente, la concentración de astaxantina es 40 % mayor en el tratamiento con nitrógeno al 4,0 % con respecto al tratamiento con nitrógeno al 5,0 % combinado con la irradiancia alta. Así mismo, se logró una mayor expresión de los genes *psy*, *pds*, *lcy bkt* y *chy* en el tratamiento con nitrógeno al 4,0 %, mientras que con nitrógeno al 5,0 % solo se expresaron los genes *psy*, *pds* y *chy*.

DISCUSIÓN

El medio de cultivo RM utilizado contiene nitrato de sodio (NaNO_3) en concentraciones que permiten un buen desarrollo celular. No obstante, al disminuir sus niveles, estimula una mayor acumulación del carotenoide, como señalan Orosa, Franqueira y Cid (2005), quienes indican que la disponibilidad de nitratos en el medio en concentraciones bajas (0,15 g/L) permite la acumulación de astaxantina y evita un cese en el proceso de división celular; como se pudo evidenciar en este trabajo de investigación.

Las concentraciones bajas de nitrógeno no afectaron el crecimiento celular ni la producción de la astaxantina, permitiendo afirmar que una concentración de nitrógeno de 4,0 % (12,0104 mg/L de NaNO_3) provoca una mayor acumulación de astaxantina en comparación con la concentración de nitrógeno al 5,0 % (15,013 mg/L de NaNO_3), según los criterios y las condiciones de estrés aplicadas en este experimento.

Las bajas concentraciones de nitrógeno ensayadas no fueron desfavorables para la microalga en cuanto a su desarrollo celular en el medio de cultivo RM. En contraste, se pudo mostrar que el porcentaje de nitrógeno al 4,0 % (12,010 mg/L de NaNO_3) provocó mayor acumulación de astaxantina en comparación con la concentración de nitrógeno al 5,0 % (15,013 mg/L de NaNO_3).

Los datos anteriores están sustentados por un registro fotográfico que permite observar los cambios morfológicos y la cuantificación de astaxantina y clorofila, evidenciando que en el tratamiento de nitrógeno al 4,0 % se inició a la producción de astaxantina en una cantidad considerable al día 15 del muestreo 5, mientras que en el tratamiento de nitrógeno al 5,0 % dicha producción se dio a partir del día 18 muestreo 6.

Las bajas concentraciones de nitrógeno no afectaron el crecimiento de *H. pluvialis*, puesto que al noveno día se estabilizó la curva de crecimiento debido a que la cantidad de nitrógeno disponible en el medio se pudo haber agotado, logrando una transición al estadio de enquistamiento de la microalga; momento en el cual se inició de producción del metabolito secundario, manteniendo las mismas concentraciones de células hasta el día 36 muestreo 12 con respecto al control (concentraciones normales de nitrógeno). Por lo anterior, se concluyó que bajas concentraciones de nitrógeno no afectan el crecimiento celular hasta cuando este se agota en el medio. De esta manera empieza la biosíntesis de astaxantina por parte de *H. pluvialis*, ya que se ha reportado que la concentración de nitrógeno baja da como resultado una productividad de biomasa reducida. Como resultado, las células pueden alcanzar un cierto grado de crecimiento/producción de biomasa desde células vegetativas verdes a los quistes rojos, sintetizando una gran cantidad de astaxantina como parte de un mecanismo de defensa enzimática celular para

hacer frente al estrés combinado, el cual es generado también por la irradiancia alta (Kurmen *et al.*, 2013).

Una característica que se observa en la microalga *H. pluvialis* al inducir un factor de estrés con la deficiencia de nitrógeno es el enquistamiento de la célula, el cual ocurre al detectar ausencia o disminución de este nutriente en el medio y que resulta en un aceleramiento de la producción de astaxantina, favoreciendo un ligero color rojo en los quistes y un aumento en su tamaño celular (Kang, An, Park, & Sim, 2006; Luna, Menéndez, Álvarez, & Flores, 2009; Niño-Castillo *et al.*, 2017) tal como se observó en este trabajo de investigación.

En el tratamiento de nitrógeno al 4,0 % se evidenció un enquistamiento de la microalga al día 15 (muestreo 5), observándose al microscopio una doble membrana, un ligero color rojo y un aumento de tamaño que se trata de un proceso de supervivencia de *H. pluvialis* al detectar una disminución de nutrientes en el medio. El mismo comportamiento se observó para el tratamiento de nitrógeno al 5,0 % al día 18 (muestro 6) y para el control al día 27 (muestro 9). Los resultados obtenidos concuerdan con que la baja concentración de nitrógeno es el mayor factor en estimular la síntesis y acumulación de astaxantina y sus acilesteres en *H. pluvialis* (Richmond, 2008).

La iluminación del cultivo de manera continua juega un papel importante en el crecimiento y la producción de astaxantina, como refieren Imamoglu *et al.* (2009) en su investigación, señalando que la iluminación continúa, en lugar de ciclos luz/oscuridad, podría ser una fuente adicional de estrés y ser utilizado para el proceso de acumulación de astaxantina. En este trabajo, el ciclo luz/oscuridad empleado fue de 20h: 4h, obteniendo una síntesis del carotenoide en cantidades favorables.

La intensidad lumínica utilizada en este proyecto fue de 140 μE que, en comparación con lo afirmado por Fábregas, Domínguez y Álvarez (1998), permite evidenciar que la intensidad de luz a la cual se puede lograr estimular la producción de astaxantina es superior a 90 μE . Por ende, se deduce que a mayor intensidad de luz se genera un tipo de estrés y una buena síntesis del carotenoide, sumando como variable que a altas intensidades de luz es posible un mayor consumo de nitrógeno ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Lo anterior se vio reflejado en los resultados obtenidos en esta investigación, ya que al combinar las variables de luz alta y deficiencia de nitrógeno se logró una aceleración en la acumulación de astaxantina.

En respuesta a la alta intensidad de luz, la clorofila y otros pigmentos involucrados en la fotosíntesis disminuyen, mientras que los carotenoides secundarios (zeaxantina, β -caroteno, astaxantina) se incrementan, funcionando a modo de agentes fotoprotectores. Estos carotenoides a menudo se acumulan en estructuras especiales tales como plastoglóbulos de plástidos o cuerpos lipídicos citoplasmáticos, contribuyendo a prevenir el exceso de la energía lumínica del alcance de la maquinaria fotosintética (Richmond, 2008).

En estudios similares se ha observado que la deficiencia de nitrógeno combinada con un alto nivel de estrés lumínico es el método más efectivo para la inducción máxima de

astaxantina (Boussiba & Vonshak, 1991; Fábregas *et al.*, 2001; Torzillo, Göksan, Isik, & Gökpınar, 2005), lo cual se estableció en este estudio, en el cual se observó mayor concentración de astaxantina cuando se trabajó con nitrógeno al 4,0 % e irradiancia de 140 μE , confirmando que la productividad máxima de astaxantina es resultado de la combinación de estos dos parámetros. El principal objetivo del cultivo de *Haematococcus* es garantizar la productividad máxima de astaxantina, debido a que, como se ha mencionado, una luz óptima en un medio de cultivo con agotamiento de nitrógeno durante la etapa roja sería la mejor condición para lograr el contenido máximo de astaxantina celular, aunque con una productividad de biomasa algo reducida.

Los factores de estrés utilizados (aumento de la intensidad de luz y deficiencia de nitrógeno) logran una reducción de la piscina plastoquinona, la cual tiene un papel de sensor que, al disminuir, activa el potencial redox del sistema fotosintético para la activación transcripcional de genes carotenogénicos (Vidhyavathi *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El tratamiento realizado bajo los factores de estrés de deficiencia de nitrógeno al 4,0 % y una irradiancia alta de 140 μE , junto con las condiciones de CO_2 al 5 %, medio de cultivo RM, pH 6,7, fotoperiodo ciclo luz/oscuridad 20h: 4h, luz blanca y una temperatura de 25 °C, permitieron obtener una mayor concentración de astaxantina ($3,52 \times 10^{-6}$ ug/cel. x mL) y la expresión de los genes *psy*, *pds*, *lcy* *bkt* y *chy*, con respecto al tratamiento con nitrógeno al 5,0 %, en el cual solo se expresaron los genes *psy*, *pds* y *chy* y se obtuvo un 40 % menos de producción de astaxantina. Sin embargo, según el ANOVA (95 %) realizado, no se presentaron diferencias significativas ($P = 0.053$) entre tratamientos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, al grupo Bioprocesos y Control (GBYC), a la Universidad de La Sabana y al Grupo de procesos agroindustriales (GIPA).

Nomenclatura

RM	Medio de cultivo Rudic
UV	Rayos Ultravioleta
pH	Concentración de Iones Hidrogeno
PSY	Gen Fitoeno Sintasa
BKT	Gen β -caroteno ketolasa
CHY	Gen β -caroteno gidroxilasa
PDS	Gen fitoeno desaturasa
LCY	Gen licopeno β -ciclase)
L	Litro
°C	Grados centígrados
USA	Estados Unidos
mL	Mililitros
cel. /mL	Células/mililitro
rpm	Revoluciones por minuto

µg/mL	Microgramo/militro
nm	Nanómetro
Ug/cel.	Microgramo/célula
ARN	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa
CDNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ITS	Espaciadores internos transcritos
pb	Pares de base
TBE	Tris-borato-EDTA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacetico
BLAST	<i>The Basic Local Alignment Search Too</i>
CO ₂ ,	Dióxido de Carbono
BBM	Medio de cultivo <i>Bold Basal Medium</i>
OHM	Medio de cultivo medio <i>Haematococcus</i>
cel./día	Células/día
µg/cel. x mL	Microgramo/célula por mililitro
NaNO ₃	Nitrato de sodio
mg/L	Miligramos/litro
g/L	Gramo/litro
µE	Microeinst
µmol m ⁻² s ⁻¹	Micromol por metro cuadrado por segundo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero

REFERENCIAS

- Abalde, J., Orosa-García, M., Torres, E., & Cid, A. (1999). La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina. En *Simposio Científico en Biología Celular y Molecular*, La Coruña, España.
- American Public Health Association [APHA] (1992). *AWWA and WEF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (18th Ed.). Washington D. C.: American Public Health Association/American Water Works Association and Water Environment Federation.
- Armenta, R. E., Guerrero-Legarreta, I., & Huerta, S. (2002). Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados. *Revista mexicana de ingeniería química*, 1(1-2), 49-55.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3-4), 277-294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Boussiba, S., & Vonshak, A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and cell Physiology*, 32(7), 1077-1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>
- Brinda, B. R., Sarada, R., Kamath, B. S., & Ravishankar, G. A. (2004). Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*—cultural and regulatory aspects. *Current Science*, 1290-1295. <https://www.jstor.org/stable/24109449>
- Candelas-Cadillo, M. G., Alanís-Guzmán, M. G. J., Bautista-Justo, M., Del Río-Olague, F., & García-Díaz, C. (2005). Contenido de licopeno en jugo de tomate seco por aspersión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4(3), 299-307.
- Cerón, M. C. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de estudios agroalimentarios*, 87(5), 83-101.
- Chavarro-Mesa, E. (2011). Variabilidad genética y detección molecular de poblaciones del hongo *Rhizoctonia solani* en regiones colombianas productoras de papa (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A., Vargas, S., Hoeneisen, M., & Gonzalez, N. (2003). Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 36(3-4), 343-357. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006>
- Córdoba-Castro, N. M., Acero-Reyes, N. L., Duque-Buitrago, L. F., Jiménez-Aguilar, L. J., Serna-Jiménez, J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus Pluvialis*. *UG Ciencia*, 21, 73-82. <https://doi.org/10.18634/ugcj.21v.1i.426>

- Domínguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., Jerónimo, F. M., & Campocosio, A. T. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 92(2), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
- Fábregas, J., Domínguez, A., Álvarez, D. G., Lamela, T., & Otero, A. (1998). Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 20(6), 623-626. <https://doi.org/10.1023/A:1005322416796>
- Gong, X., & Chen, F. (1998). Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry*, 33(4), 385-391. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00003-X)
- González, M. A., Cifuentes, A. S., & Gómez, P. I. (2009). Crecimiento y contenido total de carotenoides en cuatro cepas chilenas de *Haematococcus pluvialis* floto, bajo condiciones de laboratorio. *Gayana. Botánica*, 66(1), 58-70. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432009000100006>
- Grünwald, K., Eckert, M., Hirschberg, J., & Hagen, C. (2000). Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiology*, 122(4), 1261-1268. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1261>
- Huang, J. C., Chen, F., & Sandmann, G. (2006). Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of biotechnology*, 122(2), 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.002>
- Imamoglu, E., Dalay, M. C., & Sukan, F. V. (2009). Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New biotechnology*, 26(3-4), 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.08.007>
- Imamoglu, E., Vardar, F., Sukan, M., & Dalay, C. (2007). Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3), 5-9.
- Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., & Sim, S. J. (2006). Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 31(3), 234-238. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.08.002>
- Kobayashi, M., Kakizono, T., & Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 867-873. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.3.867-873.1993>

- Kurmen, J. E. C., González, G., & Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93-104. <https://doi.org/10.22490/24629448.1022>
- Luna, L. G., Menéndez, J., Álvarez, I., & Flores, I. (2009). Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03 T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. *Biotecnología vegetal*, 9(2), 105-117.
- Martínez-Silva, A. S. (2011). *Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga Haematococcus pluvialis (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios* (Disertación doctoral). Instituto Técnico Nacional, Ciudad de México, México.
- Mendoza, N. M., Jaramillo, C. A., Guhl, F., Padilla, J. C., & Rentería, M. C. (2001). Diagnóstico de malaria por el método de la PCR anidada. *Biomédica*, 21(4), 320-327. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v21i4.1124>
- Niño-Castillo, C. M., Rodríguez-Rivera, F. C., Díaz, L. E., & Lancheros-Díaz, A. G. (2017). Evaluation of Cell Growth Conditions for the Astaxanthin Production as of *Haematococcus pluvialis* Microalgae. *Nova*, 15(28), 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>
- Nunes, M., Vieira, A. A. H., Pinto, E., Carneiro, R. L., & Monteiro, A. C. (2013). Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* cells induced by light and nutrient stresses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 825-832. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800003>
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96(3), 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.006>
- Ponce-Palafox, J. T., Arredondo-Figueroa, J. L., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Carotenoids from plants used in diets for the culture of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5(2), 157-165.
- Qiagen (2011). *RT2 Easy First Strand Handbook, For cDNA synthesis*. Qiagen
- Ramírez-Landínez, D. M. (2013). *Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis en un fotobiorreactor tipo airlift* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Richmond, A. (Ed.). (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons.
- Sarada, R., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, 37(6), 623-627. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00246-1)

- Scibilia, L., Girolomoni, L., Berteotti, S., Alboresi, A., & Ballottari, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- Steinbrenner, J., & Linden, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant physiology*, 125(2), 810-817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>
- Steinbrenner, J., & Sandmann, G. (2006). Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7477-7484. <https://doi.org/10.1128/AEM.01461-06>
- Torzillo, G., Göksan, T., Isik, O., & Gökpinar, Ş. (2005). Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology*, 40(2), 233-240. <https://doi.org/10.1080/09670260500123609>
- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1409-1418. <https://academic.oup.com/jxb/article-abstract/59/6/1409/485379> <https://doi.org/10.1093/jxb/ern048>
- Vidhyavathi, R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2009). Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.005>
- Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresource technology*, 167, 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>
- Wang, J., Sommerfeld, M. R., Lu, C., & Hu, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2), 193-202. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.193>